ラット脂肪細胞
リアルタイム PCR プライマーセット
（Code　PCR01）
取扱説明書

PRIMARY CELL

コスモ・バイオ株式会社

ラット脂肪細胞 リアルタイム PCR プライマーセット

平成 18 年 2 月作成

脂肪細胞は、これまで考えられていたように単に中性脂肪を蓄積する細胞ではなく、アディポサイトカインと呼ばれる多彩な生理活性物質を分泌する内分泌臓器として機能することが明らかにされています。脂肪細胞の過剰状態である肥満は、糖尿病や高脂血症をはじめ種々の代謝性疾患の危険因子であり、欧米型の食生活が一般的になったことからますます増加する傾向にあります。過剰な脂肪細胞から分泌されるアディポネクチン、レプチン、PAI-1 に代表されるアディポサイトカインは、インスリン抵抗性や動脈硬化などなどいわゆるメタボリックシンドロームの成因に密接に関与することが報告されています。

近年、脂肪細胞を用いた肥満研究が盛んに行なわれるようになり、その中でもアディポサイトカインの遺伝子発現を定量的に検討することが、肥満の病態研究や抗肥満薬の開発に極めて有用であると考えられています。

本プライマーセットは、ラット内臓脂肪細胞を用いた研究において、アディポサイトカインの中でも重要と思われる５つの遺伝子を選択し、定量的にこれら遺伝子の発現量を測定できることを目的としています。

＜原理＞

- サイバーグリーン法による、相対定量法および絶対定量法（プラスミド等による検量線法）
  （本製品は TaqMan 法には対応しておりません。）

＜使用機器＞

- Applied Biosystems 7900HT リアルタイム PCR システム
  （本製品は上記機器以外への対応は未確認です。）

＜使用試薬＞

- SYBR® ExScript RT-PCR Kit (Perfect Real Time) TAKARA　RR053A
  （本製品は上記試薬以外への対応は未確認です。）

＜キット内容＞

種類	遺伝子	内容量	数量	保存温度
対象遺伝子 プライマー	PAI-1	100 回分 （約 100μl）	1 本	－20℃
	Adiponectin	100 回分 （約 100μl）	1 本	－20℃
	Leptin	100 回分 （約 100μl）	1 本	－20℃
	Insulin Receptor	100 回分 （約 100μl）	1 本	－20℃
	PPARγ	100 回分 （約 100μl）	1 本	－20℃
内部標準 遺伝子プライマー	HPRT	100 回分 （約 100μl）	1 本	－20℃
対象遺伝子 プラスミド	PAI-1	10^8 コピー/μl （約 50μl）	1 本	－20℃
	Adiponectin	10^8 コピー/μl （約 50μl）	1 本	－20℃
	Leptin	10^8 コピー/μl （約 50μl）	1 本	－20℃
	Insulin Receptor	10^8 コピー/μl （約 50μl）	1 本	－20℃
	PPARγ	10^8 コピー/μl （約 50μl）	1 本	－20℃
内部標準 遺伝子プラスミド	HPRT	10^8 コピー/μl （約 50μl）	1 本	－20℃

PAI-1　：　Plasminogen Activator Inhibitor 1
PPARγ　：　Peroxisome Proliferator Aactivated Receptor, gamma
HPRT　：　Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1

注意!!

本製品に含まれるプライマー溶液へのプラスミドの混入については最大限ご注意ください。①使用するピペットを分ける、②フィルター付チップを使用する、のいずれか、または両方を推奨いたします。

＜実施プロトコール＞

1)逆転写反応・・・使用する試薬は SYBR RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (Takara Code RR053A)です。
PCR チューブ内にて PCR ミックスを作製、サーマルサイクラーにて逆転写反応を行います。

5×M-MLV buffer	4μl
dNTP Mixture(10mM each)	1μl
Random 6mers(100μM)	1μl
Oligo dT primer(50μM)	1μl
M-MLV RTase(200U/μl)	0.5μl
RNase Inhibitor(40U/μl)	0.5μl
total RNA	1μg
RNase Free dH_2O	
Total volume	20μl

反応条件

42℃　15min

95℃　 2min

2)PCR 反応・・・使用する試薬は SYBR RT-PCR Kit (Perfect Real Time)
(Takara Code RR053A)です
Applied Biosystems 7900HT リアルタイム PCR システムにて PCR 反応と検出を行います。

1 ウェル分の反応液組成

SYBR Premix Ex Taq™(2×)	10 μl
PCR primer Mixture (10 μM)	0.8 μl
ROX Reference Dye(50×)	0.4 μl
template cDNA	1 μl
RNase Free dH_2O	7.8 μl
Total volume	20 μl

●反応液は、必ず多めに調製してください。
●発現量の低い遺伝子の場合、1 サンプルにつき 3 反復を推奨します。
●検量線は、付属のプラスミドか、cDNA、PCR 産物の段階希釈によって作製することができます。
●付属のプラスミドを使用することでサンプル中の対象遺伝子の発現コピー数が定量できます（絶対定量）。検量線の範囲は 10^2～10^6 コピー程度が一般的です。
●相対定量を行う場合は HPRT 遺伝子の検量線を作成し、サンプル中の HPRT 遺伝子発現も定量してください。

↓
384 プレートに 20 μl ずつ分注
↓
シール
スピンダウン 3500rpm for 1min
↓
装置にセットし反応開始

反応条件

ステージ 1・・・1 サイクル
95℃ 10sec
ステージ 2・・・40 サイクル
95℃ 5sec
60℃ 30sec

＜実験例：脂肪細胞の培養日数による各遺伝子発現の比較＞

VAC（Visceral Adipocyte Culture Kit／株式会社セルガレージ）にてラット内臓脂肪細胞の培養開始後 0～8 日目までの細胞から RNA を抽出し、各遺伝子の発現変化を測定したものです。まず各サンプルの対象遺伝子の発現値を内部標準の遺伝子である HPRT の発現値でそれぞれ割り相対値を算出します。次に、培養 0 日目の相対値を１として他の細胞の発現比較値を棒グラフで示しました（Fig. 1 ～ 5）。

（以下の結果については本プロトコール通りに実験を行ったときの結果です。それ以外の方法につきましては保証いたしません。）

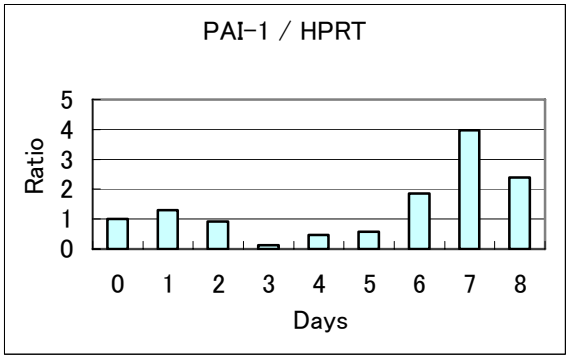

Fig. 1　PAI-1

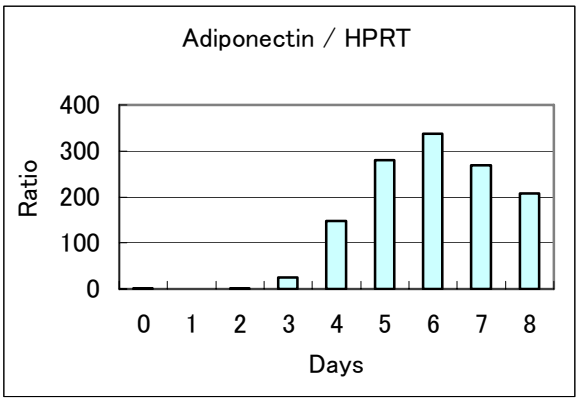

Fig. 2　Adiponectin

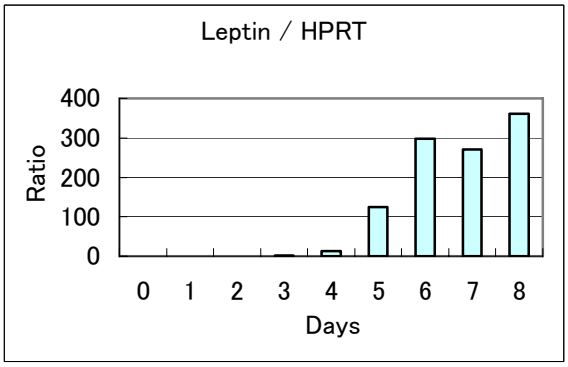

Fig.3　Leptin

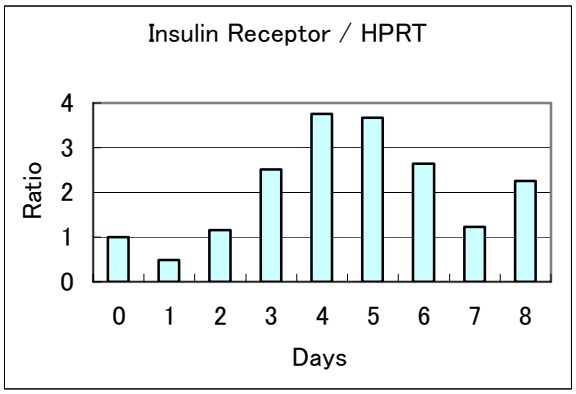

Fig. 4　Insulin Receptor

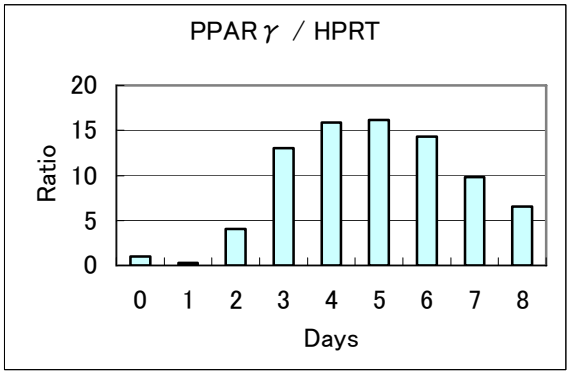

Fig.5　PPARγ

＜プライマーおよびコントロールプラスミドの品質について＞

■100 コピー程度まで安定して検出が可能です（Fig. 6, 7）。

■あらかじめコピー数の分かっているプラスミドや cDNA などを用いて作製した検量線より、遺伝子発現量の絶対値を算出することができます（Fig. 7-2）。本製品の付属プラスミドを用いて作製した検量線では傾きが 0.997 以上であることが確認されています。

■当社において Real time PCR 反応後、反応産物の dissociation curve（解離曲線）がシングルピークとなることを確認しています（Fig. 8）。このことは、増幅反応が特異的に起きていることを示しています。

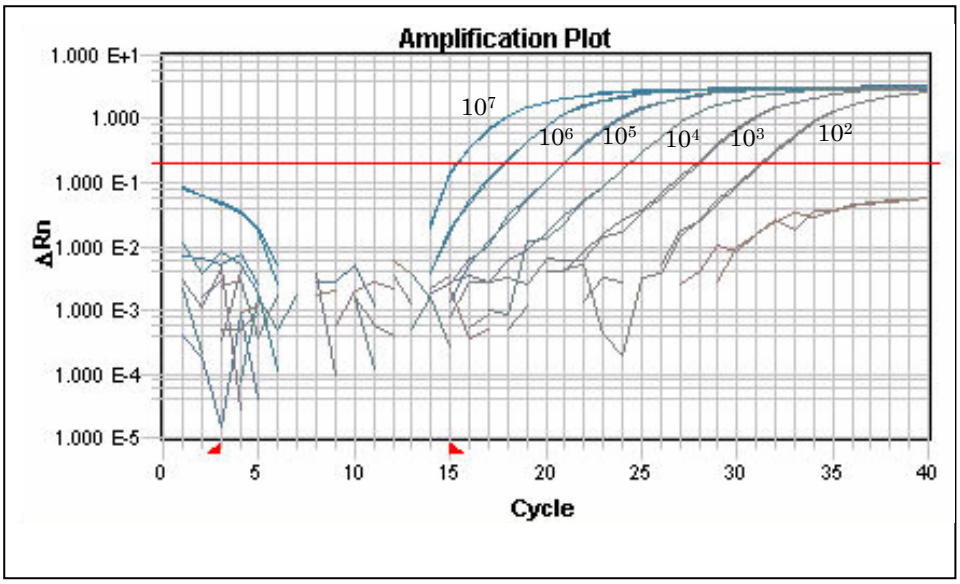

Fig.6　増幅曲線

Fig. 7-1　検量線

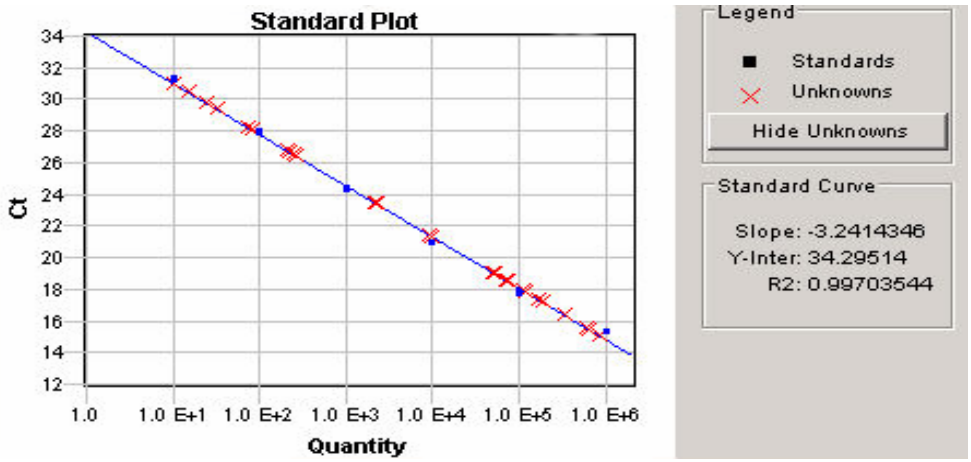

Fig. 7-2　検量線（×：サンプル）

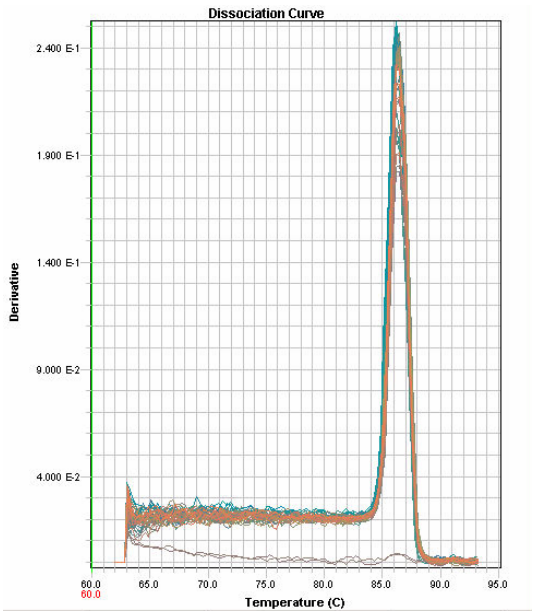

Fig. 8　解離曲線

＜関連商品＞

メーカーコード	品名
VAC01	内臓脂肪細胞培養キット　V-1（ラット、凍結）
BAT01	褐色脂肪細胞培養キット　F-1（ラット、冷蔵）
BAT02	褐色脂肪細胞培養キット　F-8（ラット、冷蔵）
WAT01	白色脂肪細胞培養キット　F-1（ラット、冷蔵）
WAT02	白色脂肪細胞培養キット　F-8（ラット、冷蔵）
AK01	GPDH 活性測定キット（冷凍）
AK06	DNA 定量キット（冷蔵）
AK09	リピットアッセイキット（室温）

その他の製品情報　http://www.primarycell.com/

＜関連サービス＞

■リアルタイム PCR 受託解析サービス

本製品のプライマーとプロトコールを用いて、遺伝子発現定量の受託解析を行います。本製品の対象遺伝子以外にも多数の定量可能な遺伝子を揃えております。詳しくは以下のサイトをご覧ください。

http://www.gene-lab.com/

■DNA アレイ受託解析サービス

・Affymetrix 社 Gene Chip 解析
・ハイスループットカスタムアレイ

詳しくは以下のサイトをご覧ください。

http://www.gene-lab.com/

在庫・納期のお問い合わせ

総発売元　**株式会社 プライマリーセル**

〒061-3242　石狩市新港中央 3 丁目 761-2
TEL 0133-60-2880　FAX 0133-60-2881
tech@primarycell.com

学術情報

開発元　**株式会社 ジェネティックラボ**

〒060-0009　札幌市中央区北 9 条西 15 丁目
28 番地 196
札幌 IT フロントビル 3F
TEL 011-644-7333　FAX 011-644-7611
adv-support@gene-lab.com